

FR 00, 2367



10069 21 AOUT 2000

REC'D 26 SEP 2000	
WIPO	PCT

10-0069074

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

07 AOUT 2000

Fait à Paris, le

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.A) OU B))

Martine PLANCHE

SIEGE
INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE
26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30





INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : (1) 42.94.52.52 Télécopie : (1) 42.93.59.30

BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

cerfa

N° 55-1328

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

27 AOUT 1999

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9910874

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

75 INPI PARIS

DATE DE DÉPÔT

27 Août 1999

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

brevet d'invention

demande divisionnaire

certificat d'utilité

transformation d'une demande de brevet européen

demande initiale

▼

brevet d'invention

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Cabinet ARMENGAUD AINE
3 avenue Bugeaud
75116 PARIS

n° du pouvoir permanent : références du correspondant

téléphone

59862

date

Établissement du rapport de recherche

différé

immédiat

oui non

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

oui non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

UTILISATION D'ACIDES AMINES POUR LA FABRICATION DE MEDICAMENTS DESTINES AU TRAITEMENT
DES INSULINO-RESISTANCES

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Forme juridique

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (1)

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (I.N.R.A.) (2)

Nationalité (s) Française

Adresse (s) complète (s)

3 rue Michel Ange — 75794 PARIS CEDEX 16

Pays

(1) FRANCE

147 rue de l'Université — 75341 PARIS CEDEX 07

(2) FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs oui non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

requise pour la 1ère fois

requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE
pays d'origine

date de dépôt

nature de la demande



7 DIMSIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

Mandataire : Alain ARMENGAUD

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI





DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR
(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

FR 99 10874

TITRE DE L'INVENTION : **Utilisation d'acides aminés pour la fabrication de médicaments destinés au traitement des insulino-résistances**

LE(S) SOUSSIGNÉ(S) **Madame PEAUCELLE Chantal**

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

- 1) RIBES Gérard - 42 Route de Lavérune - 34070 MONTPELLIER - FRANCE
- 2) TAOUIS Mohammed - 21 Allée Laurence Berluchon - 37200 TOURS - FRANCE
- 3) PETIT Pierre, Roger - 8 Grand'rue Jean Moulin - 34000 MONTPELLIER - FRANCE
- 4) BROCA Christophe - 20 rue Ecole de DROIT - 34000 MONTPELLIER - FRANCE
- 5) SAUVAIRE Yves - 246 Chemin de la Qualité - 34095 MONTFERRIER SUR LEZ - FR
- 6) PAU Bernard - Le Mas Clos n° 6 - Rue Sainte-GENEVIEVE - 34080 MONTPELLIER

FR

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Le 16 septembre 1999

N° 92-1189



DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

5 **Utilisation d'acides aminés pour la fabrication de médicaments
destinés au traitement des insulino-résistances**

L'invention vise l'utilisation d'acides aminés pour la fabrication de médicaments destinés au traitement des insulino-résistances.

10 Ces dernières années, des progrès considérables ont été réalisés dans la compréhension des mécanismes moléculaires de l'action de l'insuline. Un schéma montrant les voies principales de transduction du signal insulinaire est donné sur la figure 1. Le récepteur de l'insuline est un récepteur transmembranaire doué d'une activité tyrosine kinase intrinsèque (Combettes-Souverain M. et Issad T., Diab. Metab., 24, 477, 1998). La liaison de l'insuline à son récepteur entraîne son autophosphorylation sur les résidus tyrosine, ce qui stimule l'activité tyrosine kinase du récepteur envers un certain nombre de substrats intracellulaires tels que Insulin
15 Recepteur Substrate 1 ou IRS-1 et Src homology collagen protein ou Shc. Cette activité tyrosine kinase joue un rôle déterminant dans la transmission du signal insulinaire et elle est altérée dans de nombreuses situations de résistance à l'insuline (Ricort J.M. et coll., Diabetologia, 38, 1148, 1995). Globalement les mécanismes cellulaires de l'insulino-résistance peuvent se
20 situer au niveau de la liaison de l'hormone à son récepteur ou à une étape plus distale de post-liaison au récepteur. Comme le montre le schéma de la figure 1, la phosphorylation sur les tyrosines des IRS et de Shc par le
25

récepteur à l'insuline permet l'activation de deux grandes voies de signalisation cellulaire, la voie des MAP kinases (MAPK) et la voie de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K).

5 Les inventeurs ont précédemment rapporté l'effet insulino-sécréteur d'acides aminés hydroxylés extraits de graines de fenugrec (*Trigonella foenum graecum L.*), en particulier de la 4-hydroxyisoleucine (4-OH-Ile) et/ou de la lactone correspondante (brevets FR 2 695 317 et 2 745 718 et brevets correspondants sous priorité).

10

Or il s'avère que de tels composés sont également actifs au niveau du récepteur à l'insuline des tissus périphériques, tels que le foie et le muscle, et/ou de la cascade de signalisation que son activation déclenche.

15 Les travaux réalisés, comme illustré par les exemples, ont montré l'effet de ces composés au niveau de la cascade des phosphorylations mise en jeu sous le récepteur, notamment sur la phosphorylation d'une des principales protéines impliquée dans la transmission du signal insulinique, l'"Insulin Receptor Substrate 1" ou IRS-1. La mesure de l'activité PI 3'-kinase
20 (Phosphatidylinositol 3 kinase), enzyme activée par IRS-1 phosphorylée et jouant un rôle primordial dans la translocation du transporteur de glucose GLUT 4 a été également effectuée.

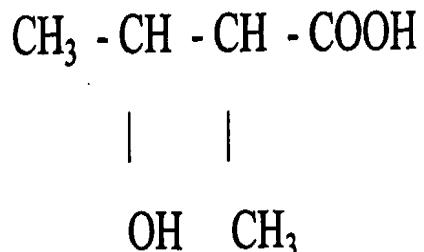
25 L'invention a pour objet de tirer profit des résultats obtenus et vise l'utilisation, pour la fabrication de médicaments destinés au traitement des insulino-résistances, d'acides aminés et/ou de leurs dérivés qui ne reconnaissent pas le récepteur de l'insuline, mais qui agissent au niveau

post-récepteur, dans les conditions rapportées dans les exemples pour la 4-OH-Ile.

L'invention vise ainsi l'utilisation d'acides aminés et/ou de leurs dérivés exerçant une activité PI-3-kinase au moins équivalente à celle de l'insuline.

5 L'utilisation pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement des insulino-résistances, selon l'invention, est alors caractérisée en ce qu'elle porte sur un acide aminé mono- ou polyhydroxylé, et/ou ses formes lactoniques.

10 L'invention vise tout spécialement l'utilisation de la 4-hydroxyisoleucine de formule



15 et/ou de sa forme lactonique.

En particulier l'invention vise l'utilisation de la 4-hydroxyisoleucine (4-

sont des facteurs socio-économiques fréquemment rencontrés dans les pays occidentaux. Tous concourent au développement d'une insulino-résistance et d'une hyperinsulinémie compensatoire, souvent associée à l'obésité et potentiellement diabétogène. Ainsi, les acides gras libres sont 5 parmi les premiers candidats avancés pour tenter d'expliquer l'étroite relation entre insulino-résistance, obésité et hyperinsulinisme (Mac Garry J.D., J. Cell. Biochem., 555, 29, 1994).

Cette évidente relation prend de nos jours la dimension d'un phénomène 10 majeur sur le plan de la santé publique. Un faisceau de preuves, à la fois cliniques et épidémiologiques, liant l'hyperinsulinémie au risque de futures maladies cardio-vasculaires, risque athérogène ou diabétogène a permis de 15 dresser le tableau cohérent du syndrome X de Reaven (hyperinsulinémie, insulino-résistance, augmentation des triglycérides sériques, hypertension artérielle) et des risques morbides qui lui sont associés (Reaven G.M., Diabetes, 37, 1595, 1988). De plus, selon de récentes enquêtes, l'hyperinsulinémie en favorisant la prolifération de certaines cellules 20 épithéliales (notamment du colon) apparaît associée au risque de cancer (Hu F.B. et coll., J. Natl. Cancer Inst., 91, 542, 1999).

25 L'invention vise donc tout spécialement l'utilisation des composés définis ci-dessus pour la fabrication de médicaments à effet insulino-mimétique et/ou insulino-sensibilisateur sur les tissus périphériques cibles de l'insuline.

25 De tels médicaments sont particulièrement appropriés pour lutter contre les syndromes d'insulino-résistance, en particulier contre les

hyperinsulinémies, l'insulino-résistance liée au vieillissement et contre des affections liées à l'obésité.

Les médicaments fabriqués conformément à l'invention pourront être 5 également utilisés pour contribuer à inhiber la prolifération de certaines lignées cellulaires associées au risque d'apparition de cancers.

Les médicaments selon l'invention peuvent être administrés par voie orale, essentiellement, mais aussi par voie intraveineuse ou intramusculaire, et 10 renferment des excipients qui sont choisis en fonction de la forme galénique adoptée.

La posologie sera adaptée en fonction de la pathologie à traiter.

15 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention sont donnés, à titre illustratif, dans les exemples qui suivent dans lesquels il est fait référence aux figures 2 à 5 (on rappelle que la figure 1 a été évoquée ci-dessus et donne le schéma des voies principales de transduction du signal

Mesure de l'activité PI 3-kinase

L'activité PI 3-kinase a été mesurée sur des immunoprecipitats réalisés 5 avec l'anticorps anti-IRS-1. Ceci a permis de déterminer l'activité enzymatique associée à l'action de l'insuline et de la comparer à l'action induite par la 4-OH-Ile.

Protocole expérimental

10

Des rats normaux Wistar mâles (souche IFFA CREDO, France) ont reçu, par injection intraperitoneale, soit de l'insuline ordinaire seule (100 U/kg) soit de la 4-OH-Ile seule (18 mg/kg), soit de l'insuline associée à la 4-OH-Ile aux mêmes posologies. Les rats témoins ont reçu par voie 15 intraperitoneale du chlorure de sodium à 9 %. Quinze minutes après l'injection, les animaux ont été sacrifiés et les tissus périphériques (foie, muscle) immédiatement prélevés et congelés dans l'azote liquide.

Pour la détermination de l'activité PI 3-kinase, les tissus sont broyés dans 20 un tampon contenant les inhibiteurs de protéases et phosphatases ainsi qu'un agent solubilisateur (Triton), comme décrit par Taouis et coll., J. Biol. Chem., 269, 14912, 1994. Après solubilisation, les surnageants sont immunoprecipités avec l'anti-IRS-1 et l'activité PI 3'-kinase est mesurée dans l'immunoprecipitat. En effet, la réaction est initiée par l'addition d'un 25 substrat artificiel de l'enzyme : le phosphatidylinositol (PI) et (³³P) gamma ATP. Le produit de la réaction est soumis à une chromatographie sur couche mince (TLC plate) et les niveaux de phosphorylation du PI sont

mesurés par un phosphoimager STORM (Molecular Dynamics). L'activité est exprimée en unité arbitraire donnée par l'appareil (conversion de la radioactivité en luminescence grâce à un faisceau laser).

5 EXEMPLE 1

Comparaison des effets de l'insuline et de la 4-OH-Ile sur l'activité PI 3-kinase du foie

10 Les résultats en histogrammes sont donnés sur la figure 2. Sur ce schéma, on observe que l'insuline mais aussi la 4-OH-Ile, seules, stimulent significativement ($p < 0,05$) l'activité PI 3-kinase hépatique. Lorsque les deux substances sont administrées ensemble, un effet plus important apparaît.

15 Ces observations démontrent que la 4-OH-Ile possède un effet insulino-mimétique au niveau du foie. De plus, l'effet plus important objectivé lorsque les deux substances sont injectées conjointement, est en faveur de

essais sont issues d'un hépatocarcinome de poulet (Kawaguchi T. et coll., *Cancer Res.*, 47, 4460, 1987).

EXAMPLE 2

5

Comparaison des effets de l'insuline et de la 4-OH-Ile sur l'activité PI 3-kinase du muscle

Les résultats en histogrammes sont reportés sur la figure 4. Sur ce schéma, 10 on note que non seulement l'insuline stimule clairement l'activité PI 3-kinase, mais aussi que la 4-OH-Ile a un effet comparable. Ainsi, l'effet insulino-mimétique de la 4-OH-Ile observé au niveau hépatique est confirmé au niveau musculaire.

15 On constate donc à l'examen des résultats des exemples 1 et 2 qu'au niveau du foie et du muscle, la 4-hydroxyisoleucine stimule indépendamment de l'insuline la voie IRS-1/PI 3-kinase qui est la voie majeure dans le contrôle des actions métaboliques et mitogéniques de l'insuline. De plus, la 4-hydroxyisoleucine ne reconnaît pas le récepteur de l'insuline ou du moins 20 ne rentre pas en compétition avec l'insuline pour la liaison sur le récepteur.

EXAMPLE 3

25 L'effet bénéfique de la 4-hydroxyisoleucine contre une relative hyperinsulinémie a été recherché *in vivo* lors de l'administration chronique (pendant un mois) de l'acide aminé végétal (25 mg/kg/jour, par voie

intrapéritonéale) sur le rat rendu diabétique non insulino-dépendant (diabète de type 2) par les injections conjointes de nicotinamide et de streptozotocine (Masiello et coll., *Diabetes*, 47, 224, 1998). Des prises de sang régulières effectuées sur la veine caudale des rats ont permis d'évaluer 5 par méthode radio-immunologique (Herbert et coll., *J. Clin. Endocr.*, 25, 1375, 1965) le taux d'insuline plasmatique, 15 heures après l'injection du produit qui avait lieu à 17 h 30. Sur ces mêmes prélèvements, le taux plasmatique de glucose a été dosé par méthode enzymatique (Trinder P., *J. Clin. Pathol.* 22, 158, 1969).

10

Les résultats obtenus sont rapportés sur la figure 5.

On observe que l'administration quotidienne de 4-hydroxyisoleucine a pour effet d'abaisser significativement ($p < 0,05$) l'insulinémie des animaux traités.

15 De plus, après l'arrêt du traitement, on peut constater que l'insuline plasmatique s'élève à nouveau pour rejoindre des valeurs proches de celles observées avant le traitement. Dans ces conditions, une légère diminution de la glycémie a été observée en fin de traitement.

20 L'abaissement de l'insulinémie observée chez le rat après un traitement chronique par la 4- hydroxyisoleucine confirme *in vivo* l'effet insulino-mimétique et/ou insulino-sensibilisateur observé lors des expériences *in vitro*.

EXEMPLE 4

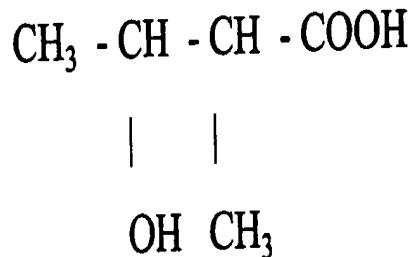
Le médicament selon l'invention est particulièrement adapté au traitement
5 symptomatique des états d'insulino-résistance, notamment des états
d'insulino-résistance avec obésité. Il peut être préparé à partir d'un acide
aminé mono- ou polyhydroxylé et/ou ses formes lactoniques à l'aide de
toute technique appropriée connue de l'homme du métier. Il peut être
notamment réalisé à partir de 4- hydroxyisoleucine. Ce produit étant
10 hydrosoluble, un tel médicament peut être aisément réalisé sous forme de
solution (dans du sérum physiologique par exemple), ou sous forme
galénique solide telle que comprimé ou gélule. Les pathologies visées étant
chroniques, l'administration par voie orale apparaît plus adaptée. De tels
médicaments peuvent ainsi être aisément administrés à des posologies
15 pluri-quotidiennes, adaptées au cas particulier du patient concerné, par
exemple de l'ordre de 2 à 3 prises par jour.

REVENDICATIONS

1) Utilisation d'un acide aminé mono- ou polyhydroxylé, et/ou ses
5 formes lactoniques, pour la fabrication d'un médicament destiné au
traitement des insulino-résistances.

2) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'acide
aminé est

10



et/ou sa forme lactonique.

15

3) Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que le 4-
hydroxyisoleucine se présente sous la forme de son isomère 2S, 3R, 4S ou
de la lactone correspondante.

6) Utilisation selon la revendication 5, pour la fabrication de médicaments contre les hyperinsulinémies.

7) Utilisation selon la revendication 5, pour la fabrication de 5 médicaments contre l'insulino-résistance liée au vieillissement.

8) Utilisation selon la revendication 5, pour la fabrication de médicaments, contre les affections liées à l'obésité.

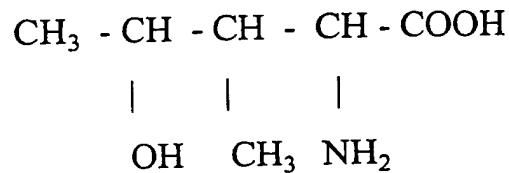
10 9) Utilisation selon la revendication 5, pour la fabrication de médicaments, pour contribuer à inhiber la prolifération de certaines lignées cellulaires associées au risque d'apparition de cancers.

post-récepteur, dans les conditions rapportées dans les exemples pour la 4-OH-Ile.

L'invention vise ainsi l'utilisation d'acides aminés et/ou de leurs dérivés exerçant une activité PI-3-kinase au moins équivalente à celle de l'insuline.

5 L'utilisation pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement des insulino-résistances, selon l'invention, est alors caractérisée en ce qu'elle porte sur un acide aminé mono- ou polyhydroxylé, et/ou ses formes lactoniques.

10 L'invention vise tout spécialement l'utilisation de la 4-hydroxyisoleucine de formule



15 et/ou de sa forme lactonique.

En particulier, l'invention vise l'utilisation de la 4-hydroxyisoleucine (4-OH-Ile en abrégé) sous la forme de son isomère 2S, 3R, 4S, ou de la 20 lactone correspondante.

Compte tenu des effets observés, les médicaments fabriqués conformément à l'invention sont particulièrement appropriés pour combattre les syndromes liés à l'insulino-résistance.

25

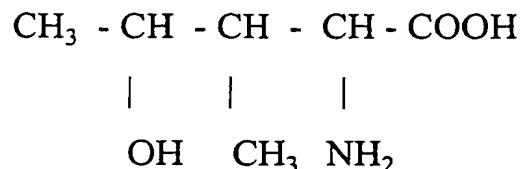
Or, on sait que la prise excessive de poids, la sédentarité, une alimentation mal équilibrée, le nombre de plus en plus important des personnes âgées

REVENDICATIONS

1) Utilisation d'un acide aminé mono- ou polyhydroxylé, et/ou ses
 5 formes lactoniques, pour la fabrication d'un médicament destiné au
 traitement des insulino-résistances.

2) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'acide
 aminé est la 4-hydroxyisoleucine de formule

10



15 et/ou sa forme lactonique.

3) Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que la 4-hydroxyisoleucine se présente sous la forme de son isomère 2S, 3R, 4S ou de la lactone correspondante.

20

4) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 pour la fabrication de médicaments à effet insulino-mimétique et/ou insulino-sensibilisateur sur les tissus périphériques cibles de l'insuline.

25

5) Utilisation selon la revendication 4, pour la fabrication de médicaments pour lutter contre les syndromes d'insulino-résistance.

Figure 1

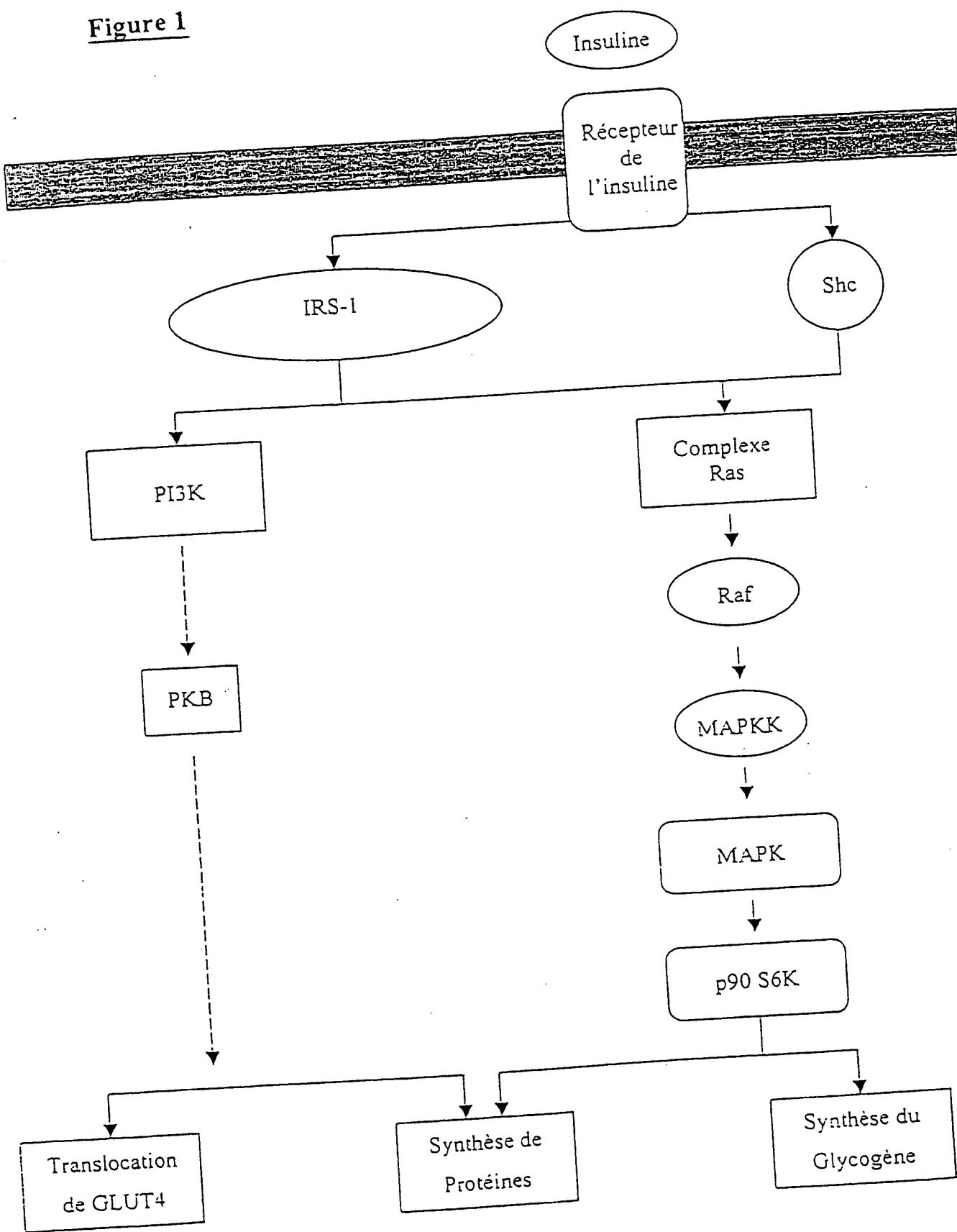
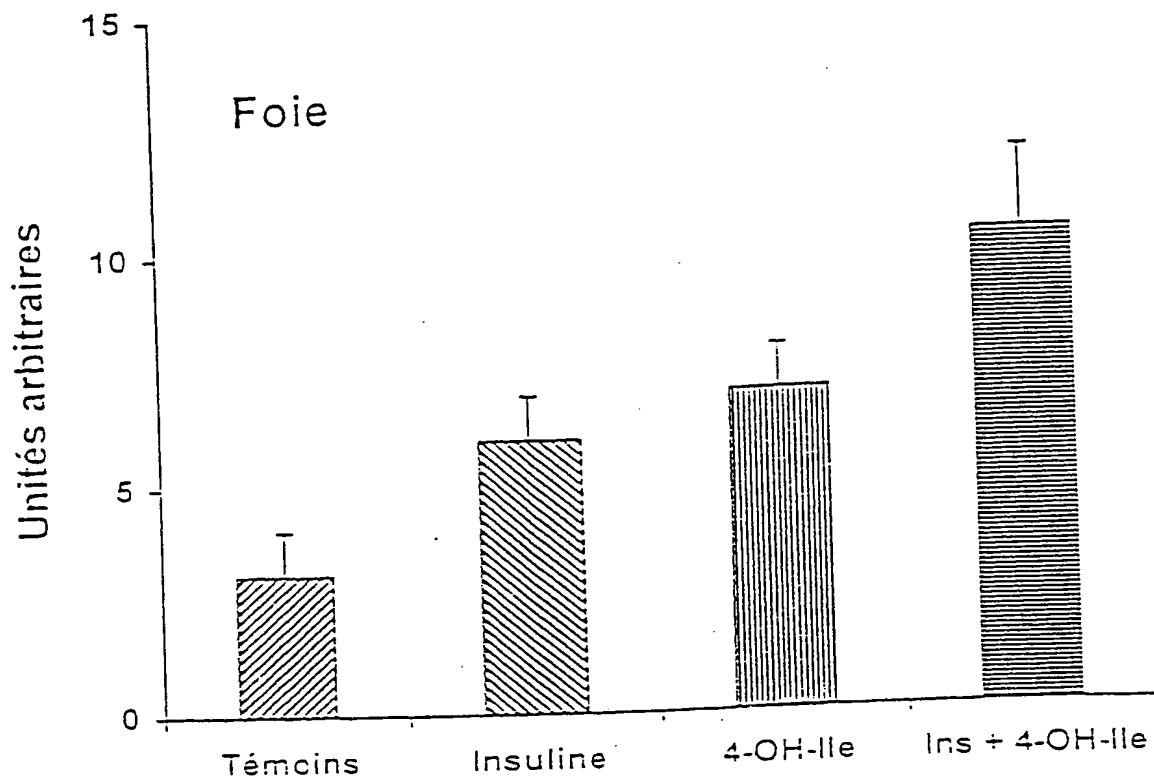
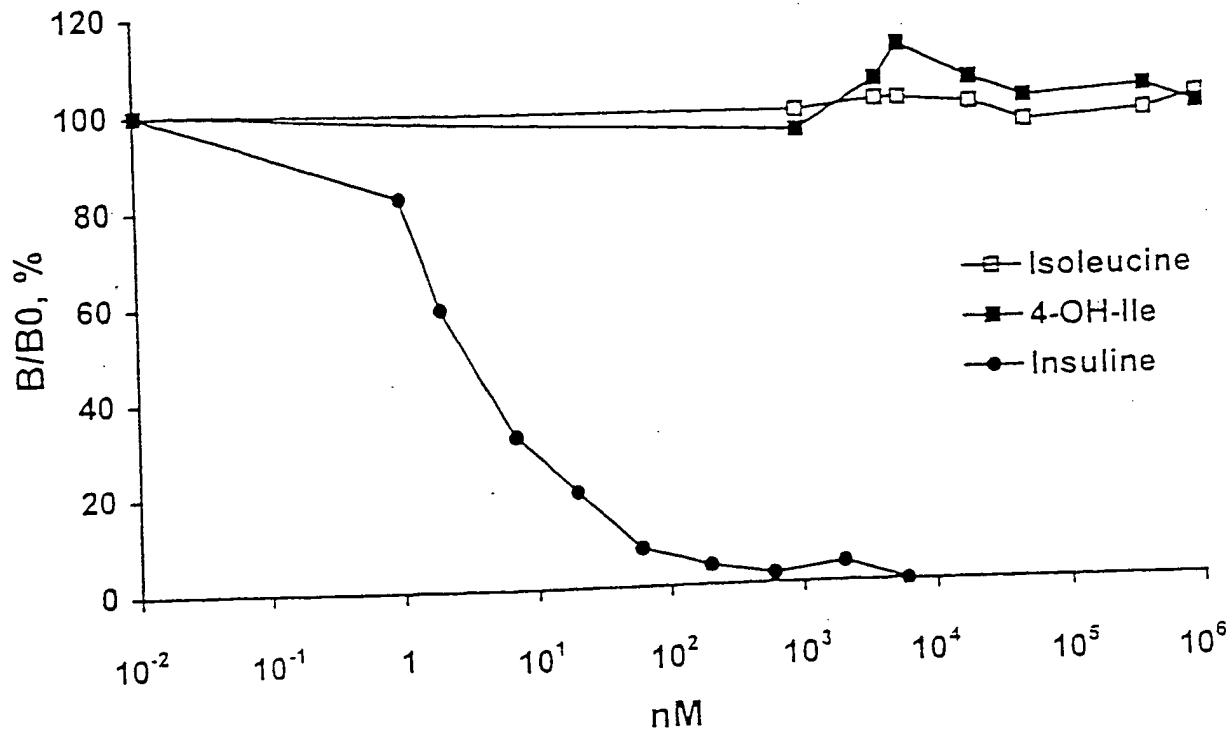


Figure 2

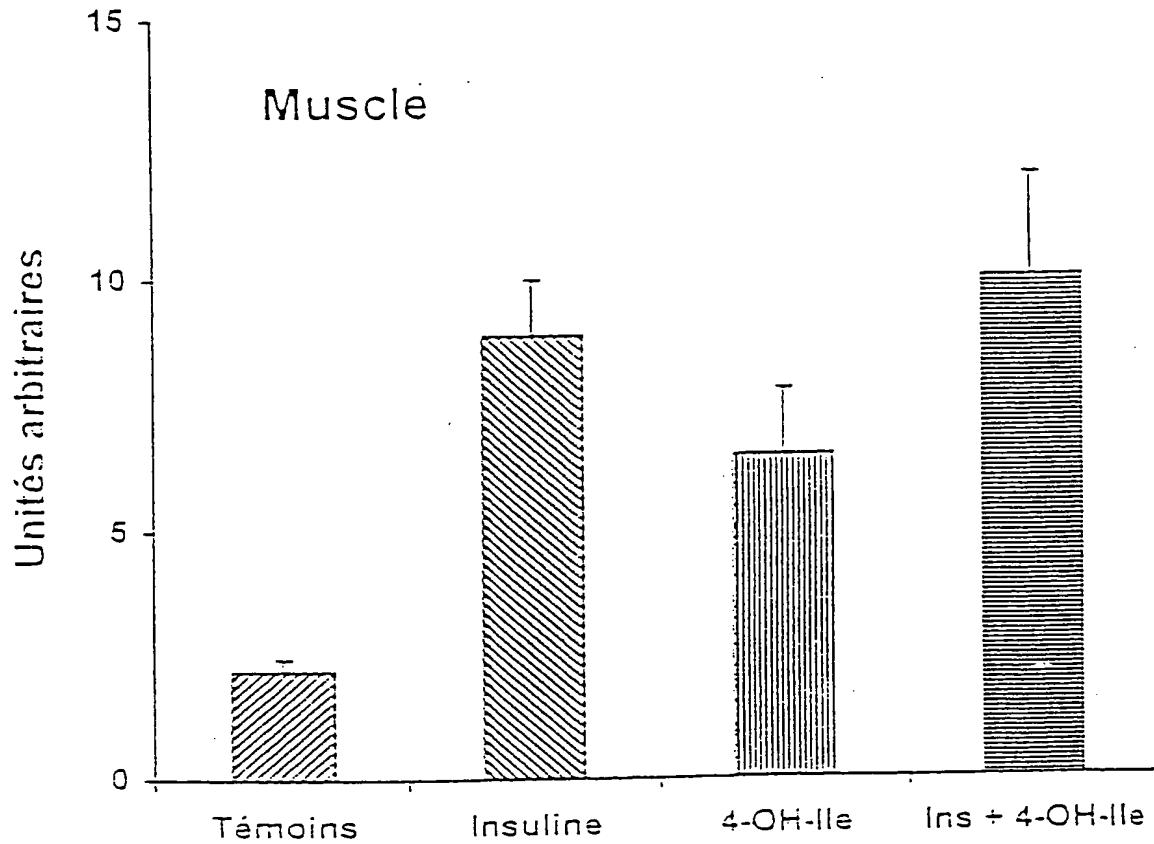


Effet de la 4-hydroxyisoleucine (4-OH-Ile)
sur l'activité PI3-Kinase du foie

Figure 3

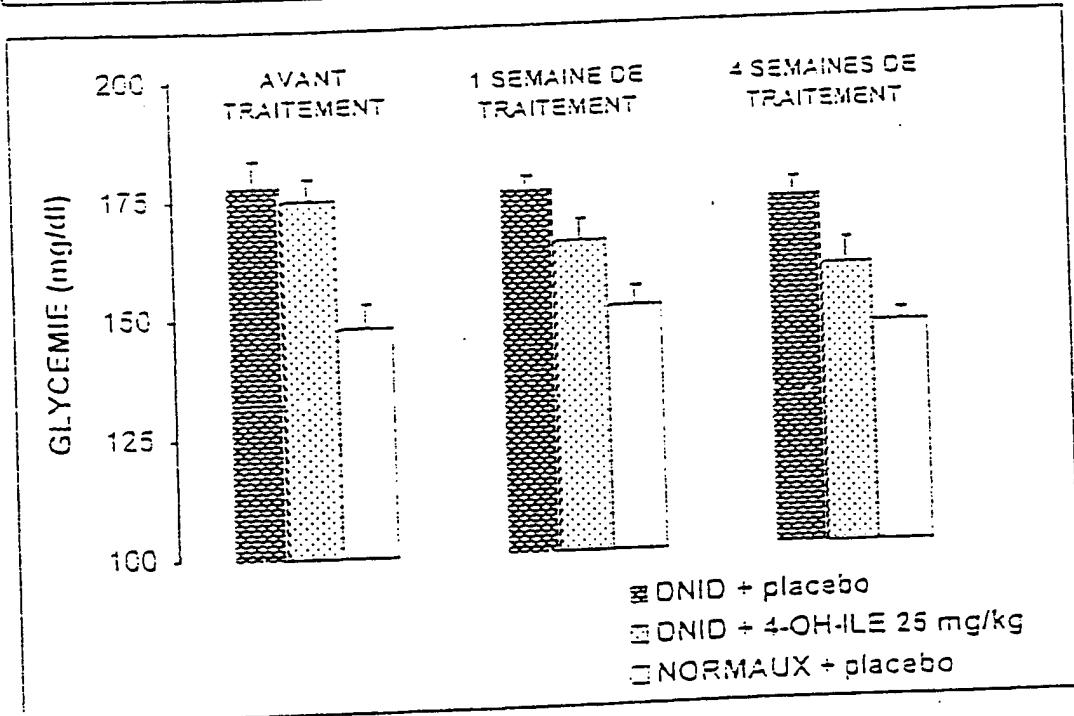
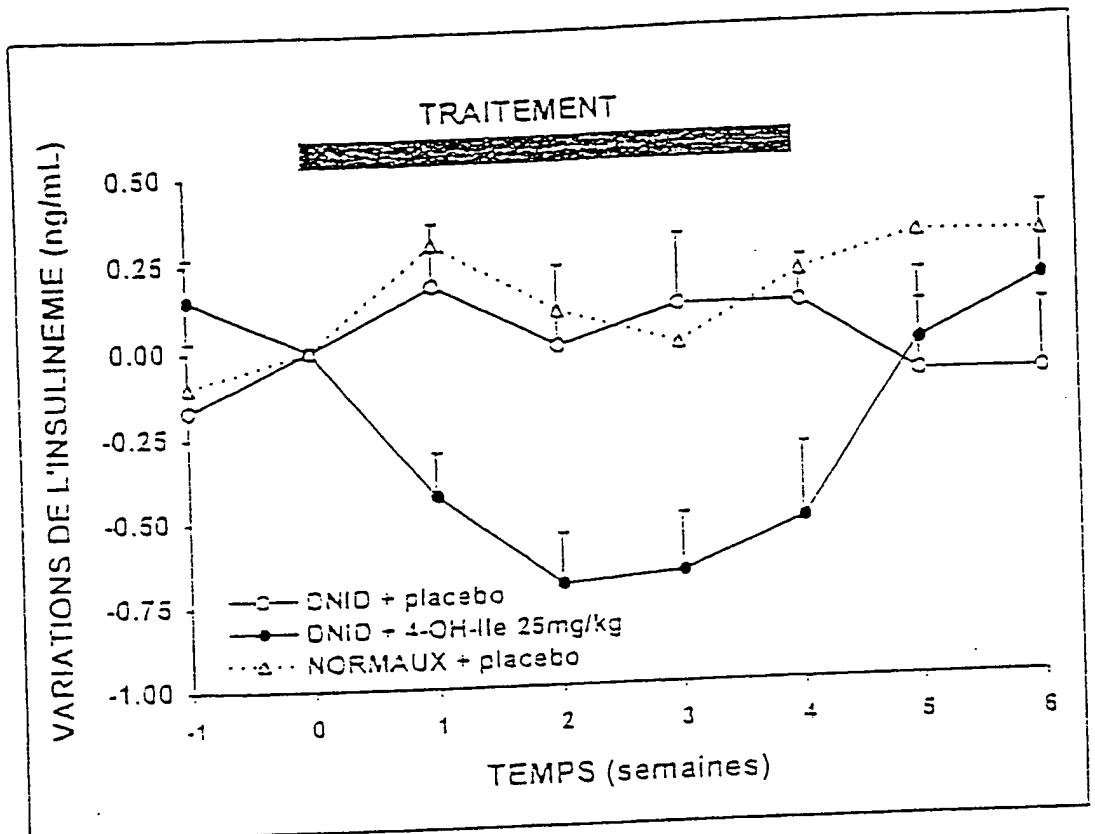
LIAISON DE L'INSULINE SUR SON RECEPTEUR DANS LES
CELLULES LMH

Figure 4



**Effet de la 4-hydroxyisoleucine (4-OH-Ile)
sur l'activité PI3-Kinase du muscle**

Figure 5



Effet de la 4-hydroxyisoleucine (4-OH-Ile)
 sur l'insulinémie et la glycémie basales du rat

